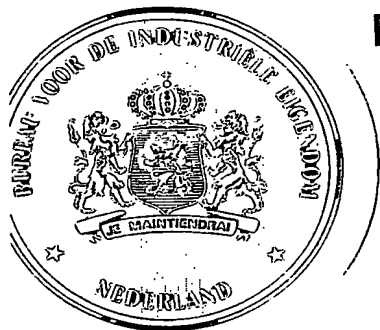


KONINKRIJK DER



NEDERLANDEN

Bureau voor de Industriële Eigendom



REC'D 03 DEC 2003

WIPO

PCT

Hierbij wordt verklaard, dat in Nederland op 11 november 2002 onder nummer 1021892,  
ten name van:

**NEDERLANDSE ORGANISATIE VOOR TOEGEPAST-  
NATUURWETENSCHAPPELIJK ONDERZOEK TNO**

te Delft

een aanvraag om octrooi werd ingediend voor:

"Detectie van demyelinisatie",

en dat de hieraan gehechte stukken overeenstemmen met de oorspronkelijk ingediende stukken.

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Rijswijk, 26 november 2003

De Directeur van het Bureau voor de Industriële Eigendom,  
voor deze,

Mw. M.M. Enhus

1021892

B. v.d. I.E.

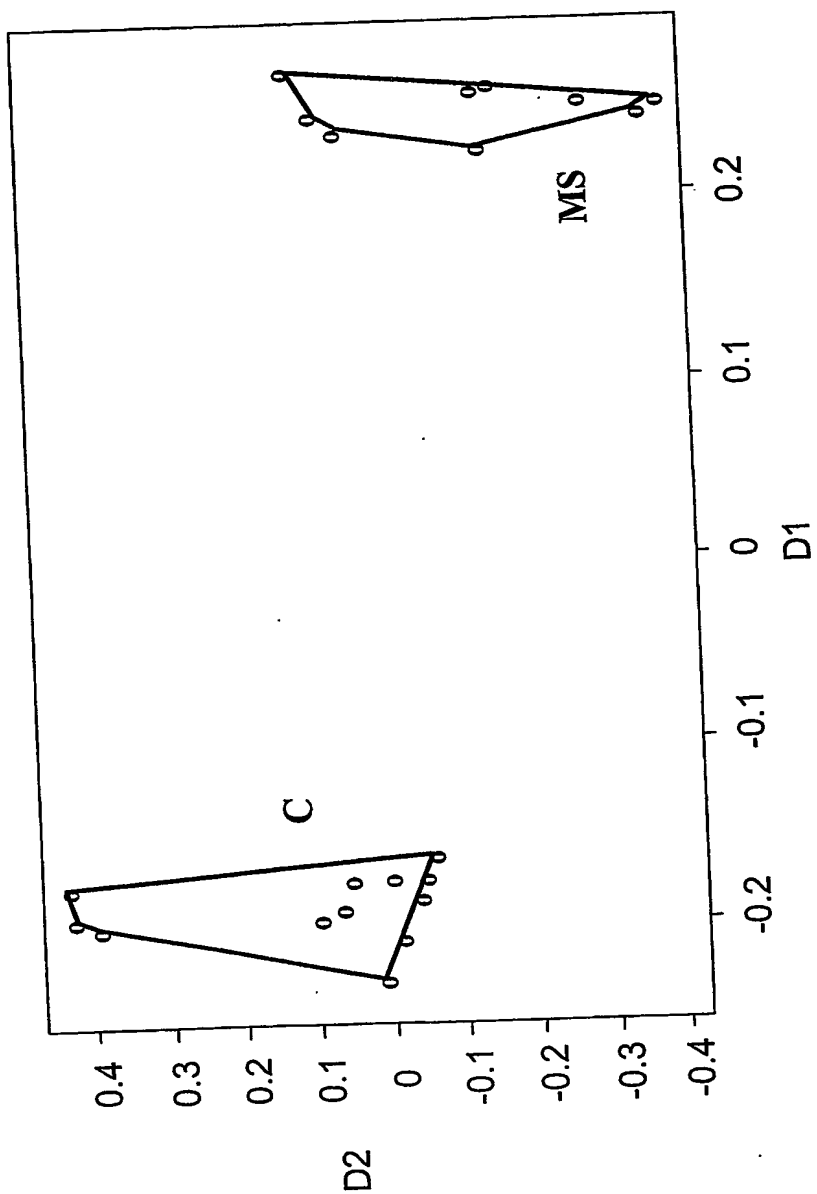
11 NOV. 2002

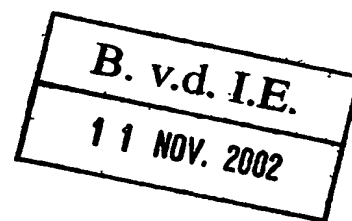
#### UITTREKSEL

De onderhavige uitvinding heeft betrekking op een werkwijze voor de detectie van demyelinisatie in een zoogdier, omvattende het verschaffen van een NMR spectrum van metabolieten in een lichaamsvloeistof van een individu van genoemd zoogdier waarin demyelinisatie wordt vermoed en het vergelijken van genoemd NMR spectrum met een verschilprofiel, omvattende een meervoudigheid van NMR spectraallijnposities, die het genormaliseerde verschil uitdrukken tussen één of meer NMR spectra van metabolieten in een lichaamsvloeistof van één of meer gezonde individuen van genoemd zoogdier, en één of meer overeenkomstige NMR spectra van metabolieten in een overeenkomstige lichaamsvloeistof van één of meer individuen van genoemd zoogdier waarin demyelinisatie is vastgesteld.

De uitvinding heeft tevens betrekking op het genoemde verschilprofiel voor de detectie van demyelinisatie in een zoogdier en op werkwijzen voor de vervaardiging daarvan. De uitvinding heeft voorts betrekking op een biomarker voor detectie van demyelinisatie, in het bijzonder multiple sclerose, met het kenmerk dat de biomarker een polaire kopgroep van fosfoglyceride is, en op de toepassing van die biomarker bij detectie van demyelinisatie en multiple sclerose.

1021032





P60473NL00

Titel: Detectie van demyelinisatie.

De uitvinding heeft betrekking op biomarkers voor detectie van demyelinisatie in een zoogdier, op een verschilprofiel tussen NMR spectra als metabolietpatroon voor vaststelling van demyelinisatie, op een werkwijze voor het vervaardigen van een dergelijk verschilprofiel en op een werkwijze voor detectie van demyelinisatie in een zoogdier met behulp van een biomarker en/of verschilprofiel volgens de uitvinding.

In het centraal zenuwstelsel (CZS) zijn de axonen omgeven door een myelineschede, die wordt geproduceerd door oligodendrocyten. De isolerende functie van de myelineschede is van belang voor de prikkelgeleiding van actiepotentialen langs de axonen. Multiple sclerose (MS) is een chronische ziekte van het CZS waarbij de beschermende myelineschede van de zenuwvezels wordt aangetast en afgebroken (demyelinisatie). Deze myelineafbraak resulteert in een (tijdelijke) onderbreking van de zenuwimpulsen en is dan ook van grote invloed op motoriek, visus, gevoel, etc. van de MS patiënt. De verharding (sclerose) van aangetast zenuwweefsel kan uiteindelijk tot permanente verlamming leiden.

MS is de meest voorkomende inflammatoire ziekte van het centraal zenuwstelsel en treft voornamelijk jong volwassenen. De ziekte kent verschillende vormen van progressie, waarbij de relapsing-remitting vorm (40% van patiënten) en de secundair progressieve vorm (40% van patiënten) zich het meest voordoen.

Inmiddels is bekend dat de relapsing-remitting vorm, waarbij aanval en herstel elkaar afwisselen, kan resulteren in de ernstiger secundair progressieve vorm. Onderzoek heeft uitgewezen dat deze groep van patiënten veel baat heeft bij het afremmen van het ziekteproces middels therapie om de overgangsperiode zo lang mogelijk uit te stellen. Een

dergelijke therapie betreft op dit moment medicatie met interferon-beta of glatirameer acetaat (copolymeer-1).

Bij de secundair progressieve uitingsvorm kent het ziektebeeld geen herstelmomenten meer en nemen de klachten slechts in aantal en  
 5 omvang toe. Ook voor deze groep van patiënten is medicatie zeer zinvol om de progressie van de ziekte te vertragen.

Er bestaat momenteel geen diagnostische test (laboratoriumbepaling of meettechniek) voor MS, waarmee de ziekte met  
 10 100% zekerheid vastgesteld kan worden. De diagnose van MS is complex en wordt gesteld op basis van een neurologisch onderzoek (motoriek, coördinatie, gevoel en reflexen) in combinatie met onderzoek aan indicatieve eiwitten in het lumbaalvocht (liquor cerebrospinalis) via een lumbale punctie en MRI (magnetic resonance imaging)-onderzoek naar het  
 15 voorkomen van ontstekingshaarden en laesies in hersenen of ruggenmerg. Deze combinatie is van belang omdat klinisch onderzoek in veel gevallen een volkomen normaal beeld laat zien, terwijl de patiënt al veel klachten heeft. Desondanks zal de neuroloog niet altijd met zekerheid de diagnose MS kunnen vaststellen. Voor feitelijke diagnose is daarom tevens het  
 20 aantonen van progressie van het ziektebeeld in de tijd noodzakelijk.

Een probleem bij het onderzoek aan MS is dat de werkelijke  
 voortschrijding van de ziekte moeilijk is vast te stellen. Ondanks dat het MRI-onderzoek van groot belang is heeft deze methode het nadeel dat het  
 niet mogelijk is om van een ontstekingshaard, die op een MRI-scan  
 25 zichtbaar is, vast te stellen of er daadwerkelijk sprake is van weefselafbraak. Het verband tussen de ernst van de ziekte en het aantal of de aard van de zichtbare ontstekingshaarden is daarvoor te gering.

Met de bestaande methodieken is de mate en snelheid van weefseldegeneratie in het centraal zenuwstelsel daarom niet of niet  
 eenvoudig te bepalen. Dit maakt het onmogelijk om al in een vroeg stadium

met therapeutische behandeling te beginnen waardoor de ziekte vaak al in een gevorderd stadium is voordat er zelfs maar medicatie toegediend wordt.

Ook beperkt de afwezigheid van vroege diagnostiek de ontwikkeling van specifiekere en effectievere therapieën. Er bestaat een  
 5 grote behoefte aan alternatieve werkwijzen die kwantitatief, betrouwbaar, gevoelig en specifiek demyelinisatie gerelateerde veranderingen in het centraal zenuwstelsel kunnen aantonen. Voorts is er behoefte aan een werkwijze waarmee in een vroeg stadium demyelinisatie kan worden gediagnosticeerd, bij voorkeur voordat het proces tot onomkeerbare  
 10 veranderingen heeft geleid.

De toepassing van moleculaire merkers (of biomarkers) die specifiek zijn voor demyelinisatie zou in deze behoeften kunnen voorzien en kan een belangrijke bijdrage leveren aan diagnose, prognose, en monitoring van de voortgang van de ziekte. Voorts zou met dergelijke moleculaire  
 15 merkers het onderzoek naar het effect van klinische behandelingstherapieën en de ontwikkeling van nieuwe medicijnen kunnen worden vergemakkelijkt. Moleculaire merkers worden dan ook cruciaal geacht voor het effectief uitvoeren van preklinische studies (zowel *in vitro* als *in vivo* in proefdieren) en studies gericht op de pathofysiologie van  
 20 demyelinisatie in het algemeen en MS in het bijzonder.

Een ideale moleculaire merker is ziekte-specifiek, weerspiegelt de werkelijke ziekte activiteit, kan gebruikt worden voor de bepaling van effectiviteit van therapie en draagt bij aan de betrouwbare prognose van de ziekte. Al deze vereisten behoeven echter niet in één enkele merker  
 25 geïntegreerd te zijn, een combinatie van complementaire merkers is mogelijk en zou in bepaalde gevallen zelfs beter kunnen werken.

Merkers die op dit moment worden toegepast in MS-gerelateerd onderzoek omvatten immunologische merkers zoals vrije lichte ketens van immunoglobuline G, cytokines en cytokine receptoren, oligoclonale banden  
 30 van antilichamen, antivirale antilichamen, intrathecale immunoglobuline

productie, T-cellen, adhesiemoleculen en andere oppervlakte moleculen. Immunologische merkers worden bepaald in bloed of lumbaalvocht. Het nadeel van dergelijke immunologische merkers is dat zij wel kenmerkend, maar niet uniek zijn voor MS.

5           Andere biomarkers die bij MS onderzoek worden toegepast zijn merkers voor weefsel van het centraal zenuwstelsel. Hiertoe behoren onder andere Myeline Basic Protein (MBP), S-100 eiwit (Missler et al. 1997. *Acta Neurol. Scand.* 96:142-4), "neuron specific enolase" (NSE) (Persson et al. 1987. *Stroke* 18:911-8), "glial fibrillary acidic protein" (GFAP) (Eng et al. 10   2000. *Neurochem. Res.* 25:1439-51), neurofilamenten (Rosengren et al. 1996. *J. Neurochem.* 67:2013-8), adhesie moleculen van zenuwcellen (Elovaara et al. 2000. *Arch. Neurol.* 57:546-51), en "ciliary neurotrophic factor" (CNTF) (Massaro. 1998. *Mult. Scler.* 4:228-31). Deze weefselmerkers zijn kenmerkend voor weefselschade en zijn daarom feitelijk geen directe 15   indicatie van demyelinisatie.

Tenslotte worden biomarkers toegepast als bijvoorbeeld gliotoxine (Menard et al. 1998. *J. Neurol. Sci.* 154:209-21), neopterine (Sorensen. 1999. *Mult. Scler.* 5:287-90) en matrix metalloproteinases (Sellebjerg et al. 2000. *J. Neuroimmunol.* 102:98-106). Dergelijke merkers zijn echter eveneens 20   geen directe merkers van het demyelinisatieproces. Voor een meer uitgebreide beschrijving van Multiple Sclerose en aspecten van de diagnostiek daarvan wordt verwezen naar bovenvermelde publicaties en de overzichtspublicatie Multiple Sclerosis: Current Status and Strategies for the Future. Joy & Johnston, eds. Nat. Acad. Press, Washington DC, 2001 en 25   verwijzingen daarin.

De onderhavige uitvinding heeft ten doel om nieuwe systemen en werkwijzen te verschaffen voor de detectie van demyelinisatie.

Een ander doel van de onderhavige uitvinding is het verschaffen van systemen en werkwijzen die ten minste enkele van de problemen

geassocieerd met bestaande systemen en werkwijzen voor de detectie van demyelinisatie zoals bovenomschreven oplossen.

5 Nog een doel van de onderhavige uitvinding is gelegen in het verschaffen van systemen en werkwijzen zoals bovenomschreven die toegepast kunnen worden in *in vivo* en/of *in vitro* medische diagnostiek.

Er is nu gevonden dat in de urine van een individu met demyelinisatie metaboliëten voorkomen die niet, of in grotere of kleinere hoeveelheid, voorkomen in gezonde individuen. De aanwezigheid van deze demyelinisatie-specifieke metaboliëtenconcentraties kon worden aangetoond  
10 met behulp van proton kernspinresonantie ( $^1\text{H}$  NMR) spectroscopische analyse van de metaboliëten in de urine van zoogdieren. Deze metaboliëten kunnen individueel of in combinatie als biomarker worden toegepast in de diagnostiek en prognostiek van demyelinisatie.

Er is verder gevonden dat een verzameling van statistisch  
15 significante verschillen tussen de signaalintensiteit van een groot aantal spectraallijnen met gedefinieerde posities in het NMR spectrum, opgenomen van metaboliëten in de urine van een gezond individu, en de signaalintensiteit van overeenkomstige spectraallijnen in het NMR spectrum opgenomen van metaboliëten in de urine van een individu met  
20 demyelinisatie een patroon kan verschaffen dat de detectie van demyelinisatie vergemakkelijkt. Dit patroon wordt in de onderhavige uitvinding aangeduid als een verschilprofiel of metabole fingerprint. Een dergelijk verschilprofiel kan grafisch worden weergegeven als een factor spectrum (zie Figuur 2).

25 De onderhavige uitvinding heeft daarom betrekking op een verschilprofiel voor de detectie van demyelinisatie in een zoogdier, omvattende een meervoudigheid van spectraallijnposities en optioneel bijbehorende signaalintensiteiten van NMR spectraallijnen, die het genormaliseerde verschil uitdrukken tussen één of meer NMR spectra van  
30 metaboliëten in een lichaamsvloeistof van één of meer gezonde individuen



van genoemd zoogdier, en één of meer overeenkomstige NMR spectra van metabolieten in een overeenkomstige lichaamsvloeistof van één of meer individuen van genoemd zoogdier waarin demyelinisatie is vastgesteld.

Figuur 1 is een weergave van een score plot van NMR spectra  
 5 verkregen op de wijze zoals beschreven in de onderstaande beschrijving en Voorbeeld 1. Op de horizontale as staat component D1 (100.00 %) uitgezet. Op de verticale as staat component D2 (0.00 %) uitgezet. Het linker ononderbroken omliggende cluster (A) is een cluster van NMR spectra van gezonde, controle individuen, terwijl het rechter onderbroken omliggende  
 10 cluster (B) een cluster van NMR spectra van patiënten met demyelinisatie weergeeft.

Figuur 2 is een weergave van een factor spectrum (ook verschilprofiel of metabole fingerprint) van demyelinisatie verkregen op de wijze zoals beschreven in de onderstaande beschrijving en Voorbeeld 1. Op  
 15 de horizontale as staat de spectraalijnspositie in "ppm" uitgezet. Op de verticale as staat de signaalintensiteit in "Regression".

Een verschilprofiel is in de onderhavige uitvinding gedefinieerd als een kenmerkende selectie van NMR spectraallijnen met gedefinieerde posities waarvan de signaalintensiteit significant verschilt in  
 20 genormaliseerde NMR spectra van metabolieten in een lichaamsvloeistof van demyelinisatie patiënten ten opzichte van genormaliseerde NMR spectra van metabolieten in een lichaamsvloeistof van gezonde individuen. Een dergelijk verschilprofiel omvat de spectraalijnsposities en eventueel de daarbij behorende signaalintensiteiten.

25 Een genormaliseerd NMR spectrum is in de onderhavige uitvinding gedefinieerd als een NMR spectrum waarin de verscheidenheid of variatie in de signaalintensiteiten van de spectraallijnen tussen monsters is beperkt door rekenkundige verdiscontering van uitschieters. Voor normalisatie wordt de som van kwadraten van alle intensiteiten gelijk gesteld aan 1. De  
 30 reden hiervoor is dat verondersteld wordt dat ieder monster een gelijke

hoeveelheid informatie omvat. Door het uitvoeren van normalisering wordt de absolute hoeveelheid informatie in ieder NMR spectrum gelijk gesteld (gelijke oppervlakten onder de NMR spectra) waardoor zij onderling vergelijkbaar worden.

5            Een veranderde signaalintensiteit van een bepaalde spectraallijn in twee vergelijkbare NMR spectra geeft aan dat de concentratie van waterstofatomen in één van die monsters is veranderd en dat daarmee de hoeveelheid van een of meer chemische bestanddelen die deze atomen bevatten, in dit geval metaboliëten, in één van die monsters is veranderd.

10           Een verschilprofiel volgens de uitvinding omvat dus een verzameling van spectraallijnposities in een genormaliseerd NMR spectrum waarvan de bijbehorende signaalintensiteit vanwege demyelinisatie significant verhoogd of verlaagd is ten opzichte van de signaalintensiteit van overeenkomstige spectraallijnposities in een genormaliseerd NMR  
15 spectrum van gezonde individuen.

Bij voorkeur omvat een verschilprofiel volgens de uitvinding spectraallijnposities waarvan de bijbehorende signaalintensiteiten in het spectrum van een demyelinisatie patiënt met een bepaalde factor verhoogd en/of verlaagd zijn ten opzichte van een corresponderende spectrum van een  
20 gezond individu. Deze factor kan worden gehanteerd door het aanleggen van een (positieve) grenswaarde (threshold of referentiewaarde) voor verhogingen en een corresponderende (negatieve) grenswaarde voor verlagingen. Spectraallijnposities waarvan de bijbehorende signaalintensiteiten boven of onder de corresponderende grenswaarde  
25 uitkomen worden in het verschilprofiel opgenomen. De endogene en exogene metaboliëten (zie hieronder) zijn uit een dergelijk verschilprofiel geëlimineerd waardoor de data tot specifieke en "significante" demyelinisatie-gerelateerde veranderingen wordt teruggebracht.

Voor het elimineren van endogene en exogene metaboliëten uit een  
30 verschilprofiel volgens de uitvinding kan zeer geschikt een grenswaarde die

correspondeert met ongeveer anderhalf maal, bij voorkeur ongeveer twee maal, bij grotere voorkeur ongeveer drie maal de signaal/ruis verhouding in het genormaliseerde spectrum worden toegepast. Hierin wordt met ruis in het NMR spectrum de signalen afkomstig van a-specifieke  
 5 meetgebeurtenissen bedoeld, zoals bijvoorbeeld machineruis, omgevingsfluctuaties, en/of vervuilingen in de chemicaliën.

Tevens is het mogelijk om als grenswaarde bijvoorbeeld de waarde van de gemiddelde signaalintensiteit van 60-99%, bij voorkeur van 70-95%, bij groter voorkeur van 80-90% van alle spectraallijnposities die een  
 10 verandering in intensiteit vertonen tussen gezonde individuen en demyelinisatie patiënten toe te passen ter verkrijging van een verschilprofiel volgens de uitvinding.

De keuze voor de hoogte van een grenswaarde zal tevens onder andere afhangen van de individuele eigenschappen van het zoogdier  
 15 waarvoor het verschilprofiel wordt vastgesteld. Dergelijke eigenschappen omvatten geslacht, leeftijd, levensfase (fertiel/infertiel), dieet, eventueel medicijngebruik, genetische achtergrond, en bij mensen tabak en/of alcoholgebruik. De toepassing van homogene groepen van individuen heeft in hieronder beschreven werkwijzen volgens de uitvinding de voorkeur,  
 20 waarbij een homogene groep is gedefinieerd als een groep van individuen met zo veel als mogelijk vergelijkbare eigenschappen en met als enkel verschil de aan- of afwezigheid van de ziekte.

Bij voorkeur omvat een genormaliseerd spectrum van metabolieten in een lichaamsvloeistof van een zoogdier een set aan gegevens die  
 25 afkomstig zijn van een homogene groep individuen. Dat wil zeggen dat een verschilprofiel volgens de uitvinding voor detectie van demyelinisatie in een mannelijk individu, NMR spectraallijnposities met bijbehorende signaalintensiteiten van bij voorkeur uitsluitend mannelijke individuen omvat. Een verschilprofiel voor demyelinisatie kan daarom verschillend zijn

afhankelijk van de eigenschappen van de individuen waaruit zij is verkregen.

Bij voorkeur vertegenwoordigt een genormaliseerd spectrum van metabolieten in een lichaamsvloeistof van een zoogdier een set aan gegevens die afkomstig is van ten minste twee, bij grotere voorkeur ten minste drie, bij nog grotere voorkeur ten minste vier en bij zelfs nog grotere voorkeur ten minste vijf individuen.

Een verschilprofiel kan zeer geschikt 3 tot 1000 spectraallijnposities die behoren bij eventueel originele spectraallijnen omvatten. Bij voorkeur omvat een verschilprofiel volgens de uitvinding 10 tot 500, bij grotere voorkeur 15 tot 100, en bij nog grotere voorkeur 20 tot 70 spectraallijnposities. Zeer goede resultaten zijn verkregen met een verschilprofiel omvattende 30 tot 50 spectraallijnposities.

Het aantal spectraallijnposities waaruit het verschilprofiel is opgebouwd wordt voornamelijk bepaald door definiëring van genoemde grenswaarde. Deze grenswaarde, waarin de waarde voor de hoogte van de ruis in de genormaliseerde spectra kan zijn verdisconteerd, geeft aan vanaf welke waarde verschillen in de hoogte van een spectraallijn tussen individuen waarin demyelinisatie is vastgesteld en gezonde individuen "significant" zijn. Een verschil in hoogte kan zowel positief (verhoging van intensiteit) als negatief (verlaging van intensiteit) zijn.

Zoals gezegd wordt de detectie van demyelinisatie door middel van een verschilprofiel volgens de uitvinding bij voorkeur toegepast op individuen met eigenschappen die overeenkomstig of gelijksoortig zijn aan die van individuen waaruit het verschilprofiel is verkregen, maar noodzakelijk is dit zeker niet.

De onderhavige uitvinding heeft tevens betrekking op een werkwijze voor het vervaardigen van een verschilprofiel voor de detectie van demyelinisatie in een zoogdier.

Een verschilprofiel volgens de uitvinding kan zeer geschikt worden vervaardigd middels een werkwijze omvattende de stap van het verschaffen van een eerste set van posities en corresponderende intensiteiten van spectraallijnen in een NMR spectrum dat is opgenomen van metaboliëten in een lichaamsvloeistof van gezonde individuen van een zoogdier.

Als lichaamsvloeistof die kan worden toegepast in een werkwijze volgens de uitvinding kan in beginsel iedere lichaamsvloeistof worden genomen. Bij voorkeur wordt een lichaamsvloeistof toegepast die op niet-invasieve wijze kan worden verkregen. De lichaamsvloeistof is bij grote voorkeur urine.

Hoewel in uitvoeringsvormen van de onderhavige uitvinding in beginsel verschillende meetmethoden voor het meten van metaboliëten in een lichaamsvloeistof toegepast kunnen worden, wordt bij voorkeur proton kernspinresonantie spectroscopie toegepast. Een NMR instrument met een frequentie van ten minste ongeveer 200 MHz is in principe geschikt, maar de voorkeur gaat uit naar toepassing van instrumenten met een hogere frequentie, zoals ten minste ongeveer 300 MHz, bij grotere voorkeur ten minste ongeveer 400-600 MHz.

Voor het uitvoeren van NMR spectroscopische analyse kunnen monsters van een lichaamsvloeistof zeer geschikt worden gevriesdroogd en het lyofilisaat kan vervolgens worden gereconstitueerd in een geschikte buffer, bijvoorbeeld een natriumfosfaat buffer, welke is bereid op basis van D<sub>2</sub>O. Een geschikte zuurgraad voor een dergelijke buffer ligt in het bereik van pH 4-10, bij voorkeur van pH 4-8 en bij grote voorkeur heeft een dergelijke buffer een pH van ongeveer 6. Bij voorkeur worden verschillende monsters die onderling vergeleken gaan worden gereconstitueerd in buffers van gelijke pH. Het reconstitueren van de gevriesdroogde bestanddelen van een monster van een lichaamsvloeistof in een buffer van gelijke pH dient ertoe om spectrale verschillen veroorzaakt door verschillen in pH tussen verschillende monsters te minimaliseren. Aan het gereconstitueerde

monster kan voorts een interne standaard, zoals bijvoorbeeld TMSP  
 (natrium trimethylsilyl-[2,2,3,3,-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-1-propionaat) of tetramethylsilaan  
 worden toegevoegd. Vervolgens kan van deze monsters een NMR spectrum  
 worden opgenomen waarbij het NMR instrument voor <sup>1</sup>H NMR analyse  
 5 wordt ingesteld. Bij voorkeur wordt een NMR spectrum van een monster in  
 triplo opgenomen. Over het algemeen kunnen hiertoe standaard instellingen  
 zoals aanbevolen door de fabrikant worden toegepast. De meetresultaten  
 worden weergegeven in chemische verschuiving ("chemical shift") ten  
 opzicht van de interne standaard en uitgedrukt in "ppm" (parts per million).  
 10 In de onderhavige uitvinding wordt, zoals gebruikelijk in het vakgebied, een  
 spectraallijnpositie uitgedrukt in "ppm", terwijl de signaalintensiteit wordt  
 uitgedrukt in "regression" (zie ook Figuur 2).

Op de opgenomen spectra wordt eventueel een manuele  
 basislijncorrectie toegepast en de spectra worden vervolgens middels  
 15 standaard NMR procedures verwerkt tot zgn. "line listings". Hiertoe worden  
 alle lijnen in de spectra boven de ruis verzameld en omgezet in een  
 gegevensbestand dat geschikt is voor multivariate data analyse.

Bij voorkeur worden meerdere gezonde individuen van betreffend  
 zoogdier gemeten zodat uitschieters rekenkundig kunnen worden  
 20 verdisconteerd. Een dergelijke rekenkundige verdiscontering van  
 uitschieters kan zeer geschikt plaatsvinden in combinatie met het proces  
 van normalisatie van de meetgegevens. Voor het bepalen van een  
 genormaliseerd spectrum van metaboliëten in een lichaamsvloeistof van een  
 gezond zoogdier kan in principe één enkel gezond individu worden gemeten,  
 25 maar bij voorkeur worden spectra afkomstig van een groep van gezonde  
 individuen gebruikt, bij grotere voorkeur een homogene groep.

Normalisatie van meerdere opgenomen NMR spectra draagt bij  
 aan de betrouwbaarheid van een set aan waarden verkregen uit een  
 meervoudigheid van individuen. Voorts maakt normalisatie de vergelijking

van een afzonderlijk opgenomen spectrum met een set aan reeds eerder opgenomen spectra mogelijk.

Een werkwijze voor het vervaardigen van een verschilprofiel omvat tevens de stap van het verschaffen van een tweede set van posities en  
5 corresponderende signaalintensiteiten van spectraallijnen in een NMR spectrum dat op overeenkomstige wijze is opgenomen van metaboliëten in een overeenkomstige lichaamsvloeistof bij individuen van datzelfde zoogdier waarin demyelinisatie is vastgesteld.

Bij voorkeur worden hier eveneens meerdere individuen van een  
10 homogene groep van betreffend zoogdier waarin demyelinisatie is vastgesteld gemeten zodat uitschieters rekenkundig kunnen worden verdisconteerd. Op de opgenomen spectra wordt eventueel een manuele basislijncorrectie toegepast en de spectra worden vervolgens middels standaard NMR procedures verwerkt tot zgn. "line listings". Hiertoe worden  
15 alle lijnen in de spectra boven de ruis verzameld en omgezet in een gegevensbestand dat geschikt is voor multivariate data analyse. De opgenomen NMR spectra worden bij voorkeur genormaliseerd op bovenomschreven wijze.

Tenslotte omvat een werkwijze voor het vervaardigen van een  
20 verschilprofiel de stap van het vergelijken van de genormaliseerde waarden van genoemde eerste en tweede set van posities en corresponderende intensiteiten van spectraallijnen in een NMR spectrum, en het detecteren van de verschillen daartussen ter verkrijging van een verschilprofiel volgens de uitvinding.

25 Multivariate data analyse of patroonherkenning kan zeer geschikt worden toegepast om verschillen gerelateerd aan ziekte en behandeling te visualiseren in deze spectra. Bijzondere voorkeur gaat uit naar de rekenkundige methode gebaseerd op het Partial-Linear-Fit algoritme zoals beschreven in WO 02/13228. Dit algoritme maakt aanpassing van kleine

variaties in de positie van de spectraallijn in NMR spectra mogelijk zonder verlies aan resolutie.

Het bovenbeschreven Partial-Linear-Fit algoritme omvat een onderdeel principale componenten discriminant analyse (PCDA). Hierbij  
5 wordt het aantal variabelen eerst gereduceerd middels principale componenten analyse (PCA). De projecties, zogenaamde scores, van monsters op de eerste principale componenten (PCs) worden als beginpunt gebruikt voor lineaire discriminant analyse. De scores van de monsters worden geplotted in een score plot, waar op elkaar lijkende monster de neiging  
10 hebben om een cluster te vormen en niet op elkaar lijkende monsters op een grotere afstand zullen liggen (zie Figuur 1). De relatie van discriminant assen met de originele variabelen (NMR signalen) wordt visueel gemaakt in een "loading" plot. Hierin wordt de positie van de originele variabelen weergegeven zodat de lengte van de variabele vector parallel aan een  
15 discriminant as proportioneel is aan de importantie ("loading") van die variabele tot die as.

Een andere mogelijkheid om de gegevens te visualiseren is door middel van factor spectra (zie o.a. Figuur 2), die correleren met de positie van clusters in score plots (bijv. het cluster demyelinisatie in Fig 1) door  
20 grafische rotatie van "loading" vectoren. Deze factor spectra, of metabolic fingerprints, gemaakt in de richting van maximale scheiding van de ene categorie ten opzichte van een andere categorie, geven inzicht in de typen metaboliëten die verantwoordelijk zijn voor scheiding tussen de categorieën.

Een verschilprofiel volgens de onderhavige uitvinding kan daarom  
25 zeer geschikt worden weergegeven als een factor spectrum, waarvan een voorbeeld is weergegeven in Figuur 2, of als een tabel met spectraallijnposities, waarvan een voorbeeld is weergegeven in Tabel 1.

Aangezien in de onderhavige uitvinding voor het verkrijgen van numerieke gegevens omtrent metaboliëten de analytische methodiek van  
30 proton kernspinresonantie spectroscopie wordt toegepast zijn de verkregen



waarden afhankelijk van de instellingen van het instrument en de condities waaronder de meting wordt uitgevoerd. Tevens zijn de absolute waarden afhankelijk van de referentie (bijv. de interne standaard) die bij de meting wordt toegepast. Een verschilprofiel, zoals dat is weergegeven in Tabel 1, 5 omvat daarmee waarden die tussen verschillende meetmomenten en tussen verschillende meetcondities kunnen verschillen. Om die reden zijn de waarden zoals weergegeven in Tabel 1 geen absolute waarden. De betekenis van de individuele waarden van zowel de spectraallijnposities als van de eventuele spectraallijnintensiteiten in het verschilprofiel voor 10 demyelinisatie is daarmee hoofdzakelijk gelegen in hun verhouding en positie ten opzichte van elkaar en dus in het patroon van deze waarden.

Door afwijkende meetomstandigheden zoals hierboven aangegeven kan de ppm waarde van een in Tabel 1 gedefinieerde spectraallijn liggen op een punt met een ppm waarde zoals in Tabel 1 gegeven  $\pm 0,05$  ppm.

15 De onderhavige uitvinding heeft voorts betrekking op een werkwijze voor de detectie van demyelinisatie in een zoogdier, omvattende de stappen van het verschaffen van een NMR spectrum van metabolieten in een lichaamsvloeistof van een individu van genoemd zoogdier waarin demyelinisatie wordt vermoed en het vergelijken van genoemd NMR 20 spectrum met een verschilprofiel volgens de uitvinding bepaald voor een overeenkomstige lichaamsvloeistof in een overeenkomstig zoogdier. Een dergelijke vergelijkingsstap kan visueel, maar ook rekenkundig worden uitgevoerd.

Het is mogelijk, maar niet noodzakelijk, om het NMR spectrum van 25 metabolieten in een lichaamsvloeistof van een individu van genoemd zoogdier waarin demyelinisatie wordt vermoed voorafgaand aan het vergelijken daarvan met een verschilprofiel volgens de uitvinding te normaliseren met behulp van spectra van metabolieten in een lichaamsvloeistof van gezonde individuen van betreffend zoogdier. Indien 30 uit de vergelijkingsstap blijkt dat het kenmerkende verschilprofiel

inderdaad omvat is in het spectrum dat is opgenomen van een individu waarin demyelinisatie wordt vermoed wordt daarmee de aanwezigheid van demyelinisatie vastgesteld.

Het is eveneens mogelijk om de gegevens van het spectrum dat is opgenomen van een individu waarin demyelinisatie wordt vermoed uit te zetten in een score-plot, zoals bijvoorbeeld het score plot van Figuur 1, en te bepalen of de gegevens vallen binnen het cluster van "demyelinisatie" spectra. Indien de bedoelde gegevens van een individu waarin demyelinisatie wordt vermoed niet binnen het cluster aangeduid met "demyelinisatie" vallen is geen sprake van de ziekte in het betreffende individu. Een dergelijke diagnostische werkwijzestap wordt in de onderhavige uitvinding geacht omvat te zijn in de stap voor het vergelijken van een NMR spectrum met een verschilprofiel.

Endogene metabolieten worden door metabole omzettingsprocessen in het lichaam gevormd en verplaatsen zich via bloedvaten of lymfevaten. Exogene metabolieten hebben hun oorsprong buiten het lichaam bijv. in de vorm van medicijnen.

Metabolieten zijn afval producten die in verschillende vormen en aantallen voorkomen in het lichaam. Zo is in een gezond lichaam de verhouding en het voorkomen van metabolieten in een lichaamsvloeistof, zoals urine of bloed, totaal anders dan in een ongezond lichaam.

Met behulp van biomarkers is het in principe mogelijk om de ongezonde toestand snel te onderscheiden van een gezonde toestand. Met een biomarker wordt in het onderhavige verband een organische verbinding of het metaboliet daarvan of specifieke patronen of specifieke hoeveelheden van meerdere organische verbindingen of hun metabolieten bedoeld die in het lichaam van een zoogdier kan/kunnen worden aangetroffen en die het gevolg is/zijn van een sub-klinische of klinische gebeurtenis in dat lichaam.

De onderhavige uitvinding verschaft een werkwijze voor de identificatie van een biomarker voor demyelinisatie, omvattende het

vervaardigen van een verschilprofiel volgens de uitvinding en het identificeren van een metaboliet gekenmerkt door één of meer gedefinieerde spectraallijnen in genoemd verschilprofiel.

5 Het bepalen van de identiteit van een metaboliet gekenmerkt door één of meer gedefinieerde spectraallijnen in een verschilprofiel kan bijvoorbeeld geschieden door koppeling van een massaspectrometer aan het NMR instrument en het analyseren van het metaboliet corresponderend met één of meer gedefinieerde spectraallijnen middels massa spectrometrie (MS). De vakman is bekend met massa spectrometrie ter identificatie van  
10 stoffen en metabolieten. Het bepalen van de identiteit van een metaboliet behorende bij één of meer gedefinieerde spectraallijnen kan evenwel ook geschieden door van bekende metabolieten het NMR spectrum op te nemen en deze te vergelijken met de NMR spectraallijnen in een verschilprofiel volgens de uitvinding.

15 Er kon worden vastgesteld dat een verschilprofiel voor demyelinisatie volgens de uitvinding, zoals weergegeven in Figuur 2 en Tabel 1, spectraallijnen met een positieve regressie bevat (*i.e.* spectraallijnen die in hoogte zijn toegenomen) die kenmerkend zijn voor polaire kopgroepen van lipiden die verwant zijn aan fosfoglyceride of polaire  
20 kopgroepen van fosfoglyceriden zelf. Er wordt verondersteld dat deze metabolieten als gevolg van de demyelinisatie en de complexe afbraak en ontstekingsverschijnselen die daarmee gepaard gaan in de urine worden uitgescheiden en dat daarmee de uitscheiding van deze metabolieten in de urine specifiek is voor de aanwezigheid van demyelinisatie.

25 Het is bekend dat myeline voor 70% uit lipiden en 15-30% uit eiwitten bestaat en in hoge mate bij draagt aan het totale lipidegehalte van de witte massa. Hoewel er geen lipiden uniek zijn voor de witte massa van het centraal zenuwstelsel verschilt de kwantitatieve lipideopbouw van witte en grijze massa aanzienlijk.

De lipide fractie van humaan myeline bevat 22% cholesterol, 15% fosfatidylethanolamine, 9% fosfatidylserine, 10% fosfatidylcholine, 8% sphingomyeline, 28% glycolipiden (voornamelijk galactocerebroside), en 8% andere lipiden. Axon membranen bevatten een specifiek type fosfoglyceride, namelijk plasmalogens. Omdat de biochemische samenstelling van  
 5 hersenmyeline van alle zoogdieren in hoge mate overeenkomt is het aannemelijk dat dezelfde waarden gelden voor diersoorten als apen, cavia's en knaagdieren.

Plasmalogens zijn fosfoglyceride-analogen met ethanolamine als de  
 10 meest gebruikelijke polaire kopgroep en met minder choline dan fosfoglyceride.

Er wordt verondersteld dat vanwege hun geringe omvang de vrijkomende polaire kopgroepen van fosfoglyceride, zoals fosfatidylethanolamine, fosfatidylcholine, fosfatidylserine of  
 15 fosfatidylinositol, snel uit de laesies vrijkomen, afgescheiden worden in de lichaamsvloeistof en uitgescheiden worden via de urine zonder wezenlijke metabole modificatie en proportioneel aan de demyelinisatieactiviteit. Het is niet bekend of de polaire kopgroepmoleculen in vrije toestand of in een gederivatiseerd vorm, bijvoorbeeld geconjugeerd aan sulfaat of fosfaat, in de  
 20 urine worden uitgescheiden.

De hierboven vermelde metabolieten komen in verhoogde hoeveelheid voor in de urine van demyelinisatie patiënten, en zijn daarom uitermate geschikt om te worden toegepast als biomarker. Metabolieten die in hoeveelheid afnemen laten zich minder goed toepassen als biomarker  
 25 vanwege het gevaar van vals negatieve uitslagen bij bepaalde detectiemethoden.

Metabolieten met een positieve regressie in een verschilprofiel volgens de uitvinding kunnen daarom zeer geschikt worden toegepast als biomarker in een systeem voor de snelle en vroegtijdige detectie van  
 30 demyelinisatie. Het zal in veel gevallen niet uit een verschilprofiel kunnen

worden opgesteld of de metaboliëten in vrije toestand of in een gederivatiseerd vorm, bijvoorbeeld geconjugeerd of op andere wijze gebonden, in de urine worden uitgescheiden. Zo kunnen polaire kopgroepen bijvoorbeeld nog gebonden zijn aan glycerol. De vakman zal evenwel  
5 begrijpen dat de beschreven metaboliëten in welke toestand dan ook in de lichaamsvloëistof voorkomend als biomarker kunnen worden toegepast.

De uitvinding heeft dan ook tevens betrekking op een biomarker voor diagnose en prognose van demyelinisatie in het algemeen en multiple sclerose in het bijzonder, met het kenmerk dat de biomarker een polaire  
10 kopgroep van fosfoglyceride is.

Een biomarker volgens de uitvinding, kan gekozen worden uit de groep bestaande uit fosfatidylethanolamine, fosfatidylcholine, fosfatidylserine en/of fosfatidylinositol, delen of derivaten daarvan.

De onderhavige uitvinding heeft voorts betrekking op een  
15 werkwijze voor de detectie (i.e. het diagnosticeren en/of prognosticeren) van demyelinisatie in een zoogdier, omvattende het meten van een biomarker volgens de uitvinding in een lichaamsvloëistof, bij voorkeur urine. Een dergelijke meting omvat bij voorkeur het detecteren, in een lichaamsvloëistof van een individu van een zoogdier waarin demyelinisatie  
20 wordt vermoed, van een kwantitatieve verandering in het voorkomen van een biomarker ten opzicht van een normale waarde voor die biomarker die wordt aangetroffen in een lichaamsvloëistof van gezonde individuen en welke kwantitatieve verandering overeenkomt met de regressie van die biomarker in het verschilprofiel voor demyelinisatie.

25 Een meting van een biomarker kan tevens de detectie van een patroon van concentraties of hoeveelheden metaboliëten in een lichaamsvloëistof van een individu van een zoogdier waarin demyelinisatie wordt vermoed omvatten in het geval dat de biomarker een patroon van meerdere metaboliëtenconcentraties is. Indien een dergelijk patroon van  
30 concentraties of hoeveelheden van metaboliëten, welke patroon wordt

gemeten in de vorm van een biomarker-meting in een individu van een  
zoogdier, overeenstemt of correspondeert met het verschilprofiel van de  
betreffende ziekte waarvoor de biomarker is bepaald, dan is sprake van de  
aanwezigheid van de ziekte in dat individu. In dat geval is sprake van een  
5 kwalitatieve biomarker-meting.

Een werkwijze voor detectie van demyelinisatie in een zoogdier  
volgens de uitvinding omvat dus de kwantitatieve of kwalitatieve detectie  
van een biomarker volgens de uitvinding in een lichaamsvloeistof van dat  
individu.

10 Een meting van een biomarker volgens de uitvinding wordt bij  
voorkeur aan urine uitgevoerd.

Een meting van een biomarker in een lichaamsvloeistof van een  
individu van een zoogdier voor de detectie van demyelinisatie volgens de  
uitvinding zal altijd de stap omvatten van het vergelijken van de gevonden  
15 meetwaarde met een referentie, welke referentie kan omvatten een  
kenmerkende waarde voor gezonde individuen en/of een kenmerkende  
waarde voor individuen waarin demyelinisatie is vastgesteld.

Een diagnose kan worden gesteld op basis van de resultaten van de  
meting van een biomarker volgens de uitvinding. Zo zal een normaal niveau  
20 van metabolieten of een normaal patroon van metabolieten de diagnose  
"gezond" verschaffen. Daarentegen zal een afwijkend metabolietenpatroon  
of een afwijkend metabolietenniveau de diagnose "demyelinisatie"  
verschaffen.

Middels de onderhavige uitvinding is het dus mogelijk om  
25 demyelinisatie in een zoogdier te detecteren door het waarnemen van  
specifieke biochemische veranderingen in de lichaamsvloeistof van een  
individu van een zoogdier, welke veranderingen bij voorkeur worden  
gedetecteerd middels meting van een biomarker volgens de uitvinding.

Genoemde biomarker kan op verschillende wijzen worden  
30 gedetecteerd in een lichaamsvloeistof. Zo kunnen bijvoorbeeld NMR en/of

Massa Spectrometrie (MS) worden toegepast op een monster van een lichaamsvloeistof.

- Een eenvoudigere en snellere diagnose zou gesteld kunnen worden door toepassing van microsysteemtechnologieën, bijvoorbeeld een
- 5 "microfluidics" instrument in combinatie met specifiek fluorescerende enzymen waarmee kwantitatief en kwalitatief de metaboliëten voorkomend in de te testen samples gemeten kunnen worden. De vakman zal zich zonder veel problemen op de hoogte kunnen stellen van de stand van de techniek op het gebied van de snelle detectie van metaboliëten om werkwijzen op te
- 10 stellen voor het detecteren van biomarkers volgens de onderhavige uitvinding in een lichaamsvloeistof van een zoogdier ter diagnose en/of prognose van demyelinisatie. (Zie bijvoorbeeld Microfabrication Technology for Biomedical Innovations. Proc. Cambridge Healthtech Inst. 3rd Annual Conf., October 1997, San Jose, USA)
- 15 Met behulp van de onderhavige systemen en werkwijzen kan demyelinisatie op kwantitatieve wijze worden vastgesteld. Hiertoe kan bijvoorbeeld een database worden samengesteld van sets aan NMR spectra van metaboliëten in een lichaamsvloeistof van individuen waarin demyelinisatie is vastgesteld en waarbij de demyelinisatie zich in
- 20 verschillende stadia van progressie bevindt en waarbij deze sets worden geannoteerd aan kwantitatieve gegevens van de progressie van de demyelinisatie, bijvoorbeeld in combinatie met MRI of andere biomarkers. Door het opstellen van verschilprofielen voor demyelinisatie in verschillende stadia van progressie kan een kwantitatieve reeks van verschilprofielen
- 25 worden verkregen. Middels het uitvoeren van een vergelijking tussen een NMR spectrum van een individu waarin demyelinisatie wordt vermoed of waarvan de ernst van de demyelinisatie moet worden bepaald en de genoemde kwantitatieve reeks van verschilprofielen kan de aanwezigheid van demyelinisatie kwantitatief worden uitgedrukt. Voorts kan de
- 30 voortschrijding van de ziekte op deze wijze kwantitatief worden gevolgd.

Tevens is het mogelijk om voor kwantitatieve analyse van demyelinisatie een biomarker volgens de uitvinding tot te passen. Zoals bovenomschreven omvat een dergelijke analyse het kwantitatief meten van polaire kopgroepen van fosfoglyceride in een lichaamsvloeistof, bij voorkeur  
 5 urine.

Door toepassing van de onderhavige uitvinding in combinatie met metabole en fysiologische metingen in of aan zenuwweefsel, bijvoorbeeld door het meten van metabole veranderingen in het CZS weefsel middels zgn "magnetization transfer", is het nu mogelijk om de reeds aanwezige  
 10 myelineafbraak in het centraal zenuwstelsel vast te stellen en te kwantificeren. Deze analyse van demyelinisatie, de kennis van de pathogenese en de efficiëntie van therapieën kunnen door toepassing van de onderhavige uitvinding sterk verbeteren. Middels toepassing van een biomarker volgens de uitvinding is het nu dus mogelijk om het feitelijke  
 15 demyelinisatie proces te monitoren.

De uitvinding kan worden toegepast op zoogdieren in het algemeen en op paardachtigen, runderachtigen, varkensachtigen, schaapachtigen, muisachtigen, hondachtigen, knaagdierachtigen, aapachtigen en primaten in het bijzonder. Bij voorkeur wordt de uitvinding toegepast op cavia's,  
 20 honden of mensen.

De uitvinding zal hieronder worden geïllustreerd aan de hand van een voorbeeld.

Voorbeeld 1.

#### 25 *Monster voorbereiding*

Voorafgaand aan NMR spectroscopische analyse werden 1 ml urine monsters gelyophiliseerd en gereconstitueerd in 1ml natrium fosfaat buffer (pH 6.0, op basis van D<sub>2</sub>O) met 1 mM natrium trimethylsilyl-[2,2,3,3, 2H<sub>4</sub>]-1-propionaat (TMSP) als interne standaard.



### *NMR metingen*

NMR spectra werden in drievoud en volledig geautomatiseerd opgenomen op een Varian UNITY 400 MHz spectrometer voorzien van een proton NMR set-up en bij een werkingstemperatuur van 293 K. Free induction decays (FIDs) werden verzameld als 64K datapunten met een  
 5 spectrale bandbreedte van 8000 Hz; 45 graden pulsen werden toegepast met een meettijd van 4,10 sec. en een ontspanningsvertraging ("relaxation delay") van 2 sec. De spectra werden bepaald door accumulatie van 128 FIDs. Het signaal van het residuele water werd verwijderd middels een  
 10 voor-verzadigingstechniek waarbij de water-piek werd bestraald met een constante frequentie gedurende 2 sec voorafgaand aan de meetpuls.

De spectra werden bewerkt met behulp van de standaard Varian software. Op alle spectra werd een exponentiele window-functie met een lijnverbreding van 0,5 Hz en een handmatige basislijn correctie toegepast.

15 Na referentie met de interne NMR standaard (TMSP  $\delta = 0,0$ ) werden lijnreeksen samengesteld met behulp van de standaard Varian NMR software. Ter verkrijging van deze lijnreeksen werden alle lijnen in de spectra met signaal intensiteit boven de ruis verzameld en omgezet naar een gegevensbestand dat geschikt was voor toepassing van multivariate  
 20 data-analyse.

### *Bepaling van metabole fingerprint of verschilprofiel van demyelinisatie metaboliëten*

Met behulp van een 400 MHz NMR spectrometer werden  
 25 urinemonsters onderzocht van gezonde individuen en van individuen waarin demyelinisatie was vastgesteld. De spectra werden verwerkt en lijnreeksen werden samengesteld met behulp van standaard Varian software na referentie aan de interne standaard. Het NMR data-reductiebestand werd geïmporteerd in Winlin VI. 10. Kleine variaties  
 30 van vergelijkbare signalen in verschillende NMR spectra werden aangepast

middels toepassing van het Partial-Linear-Fit algoritme zoals beschreven in WO 02/13228 en de lijnen werden gefit zonder verlies in resolutie. De schaal van de data werd automatisch aangepast en "genormaliseerd" naar eenheidsintensiteit. De endogene en exogene metaboliëten werden  
5 geëlimineerd van de NMR spectra, hetgeen leidde tot het reduceren van de data tot specifieke en "significante" demyelinisatie-gerelateerde veranderingen. Hiertoe werd een grenswaarde toegepast waarmee 80-90% van de spectraallijnposities werd geëlimineerd.

Een score plot van de NMR spectra werd gemaakt met behulp van  
10 multivariate data-analyse als bovenomschreven. Uit het score plot werd een metabole fingerprint of verschilprofiel van demyelinisatie verkregen door het selecteren van stijgende en dalende NMR signalen met relatief hoge frequentie van voorkomen in urine van demyelinisatie patiënten. Hieruit werd een keus gemaakt van ongeveer 35 NMR signalen met een  
15 relevante bijdrage aan demyelinisatie (regressie  $>0.5$ ). Deze NMR signalen zijn weergegeven in Tabel 1 en Figuur 2.

*Tabel 1: Kenmerkende stijgende en dalende NMR spectraalijnpotities vanwege demyelinisatie*

NMR spectraalijnpotities met stijgende waarden vanwege demyelinisatie in ppm $\pm$ 0.05	NMR spectraalijnpotities met dalende waarden vanwege demyelinisatie in ppm $\pm$ 0.05
0.90	0.95
1.22	1.27
2.98	2.17
3.25	2.48
3.82	2.61
	2.93
	3.20
	3.50
	3.54
	3.56
	3.61
	3.81
	3.94
	3.96
	4.09
	4.10
	4.19
	7.00
	7.31

## CONCLUSIES

1. Biomarker voor detectie van demyelinisatie, met het kenmerk dat de biomarker een polaire kopgroep van fosfoglyceride is.
2. Biomarker volgens conclusie 1, waarin genoemde polaire kopgroep fosfatidylethanolamine, fosfatidylcholine, fosfatidylserine, en/of fosfatidylinositol, of een deel of een derivaat daarvan is.
3. Gebruik van een biomarker volgens conclusie 1 of 2, voor het monitoren van demyelinisatie.
4. Gebruik van een biomarker volgens conclusie 1 of 2, voor diagnose en prognose van multiple sclerose.
5. Werkwijze voor diagnose en prognose van demyelinisatie in een zoogdier, omvattende het meten van een biomarker volgens een van de conclusies 1-4 in een lichaamsvloeistof van een individu van betreffend zoogdier.
6. Werkwijze volgens conclusie 5 waarin genoemde biomarker wordt gemeten middels proton kernspinresonantie spectroscopische analyse van metaboliëten in een lichaamsvloeistof en waarin genoemde lichaamsvloeistof urine is.
7. Verschilprofiel voor de detectie van demyelinisatie in een zoogdier, omvattende een meervoudigheid van spectraallijnposities en optioneel bijbehorende signaalintensiteiten van NMR spectraallijnen, die het genormaliseerd verschil uitdrukken tussen één of meer NMR spectra van metaboliëten in een lichaamsvloeistof van één of meer gezonde individuen van genoemd zoogdier, en één of meer overeenkomstige NMR spectra van metaboliëten in een overeenkomstige lichaamsvloeistof van één of meer individuen van genoemd zoogdier waarin demyelinisatie is vastgesteld.
8. Verschilprofiel volgens conclusie 7, waarin genoemd zoogdier is gekozen uit de groep bestaande uit mensen, honden en cavia's.

9. Verschilprofiel volgens conclusie 7 of 8, waarin genoemde lichaamsvloeistof urine is.
10. Verschilprofiel volgens conclusie 9, omvattende de spectraallijnen en daarbij corresponderende waarden volgens tabel 1.
- 5 11. Werkwijze voor de detectie van demyelinisatie in een zoogdier, omvattende de stappen van het verschaffen van een NMR spectrum van metabolieten in een lichaamsvloeistof van een individu van genoemd zoogdier waarin demyelinisatie wordt vermoed en het vergelijken van genoemd NMR spectrum met een verschilprofiel volgens één van de
- 10 conclusies 7-10, bepaald voor een overeenkomstige lichaamsvloeistof.
12. Werkwijze volgens conclusie 11, waarin genoemd zoogdier is gekozen uit de groep bestaande uit mensen, honden en cavia's.
13. Werkwijze volgens conclusie 11 of 12, waarin genoemde lichaamsvloeistof urine is.
- 15 14. Werkwijze voor het vervaardigen van een verschilprofiel voor demyelinisatie in een zoogdier, omvattende de stappen van: a) het verschaffen van een eerste set van posities en corresponderende signaalintensiteiten van spectraallijnen in een NMR spectrum opgenomen van metabolieten in een lichaamsvloeistof van één of meer gezonde
- 20 individuen van genoemd zoogdier; b) het verschaffen van een tweede set van posities en corresponderende signaalintensiteiten van spectraallijnen in een NMR spectrum opgenomen van metabolieten in een overeenkomstig lichaamsvloeistof van één of meer individuen van genoemd zoogdier waarin demyelinisatie is vastgesteld; en c) het detecteren van de verschillen tussen
- 25 de genormaliseerde waarden van genoemde eerste en tweede set, ter verkrijging van genoemd verschilprofiel.
15. Werkwijze volgens conclusie 14, waarin de bepaling van genoemde genormaliseerde waarden de toepassing van de methode volgens WO 02/13228 omvat.

16.       Werkwijze voor het identificeren van een biomarker voor demyelinisatie, omvattende het vervaardigen van een verschilprofiel volgens een van de conclusies 7-10 en het identificeren van een metaboliet gekenmerkt door één of meer gedefinieerde spectraallijnen in genoemd
- 5   verschilprofiel.

1021092

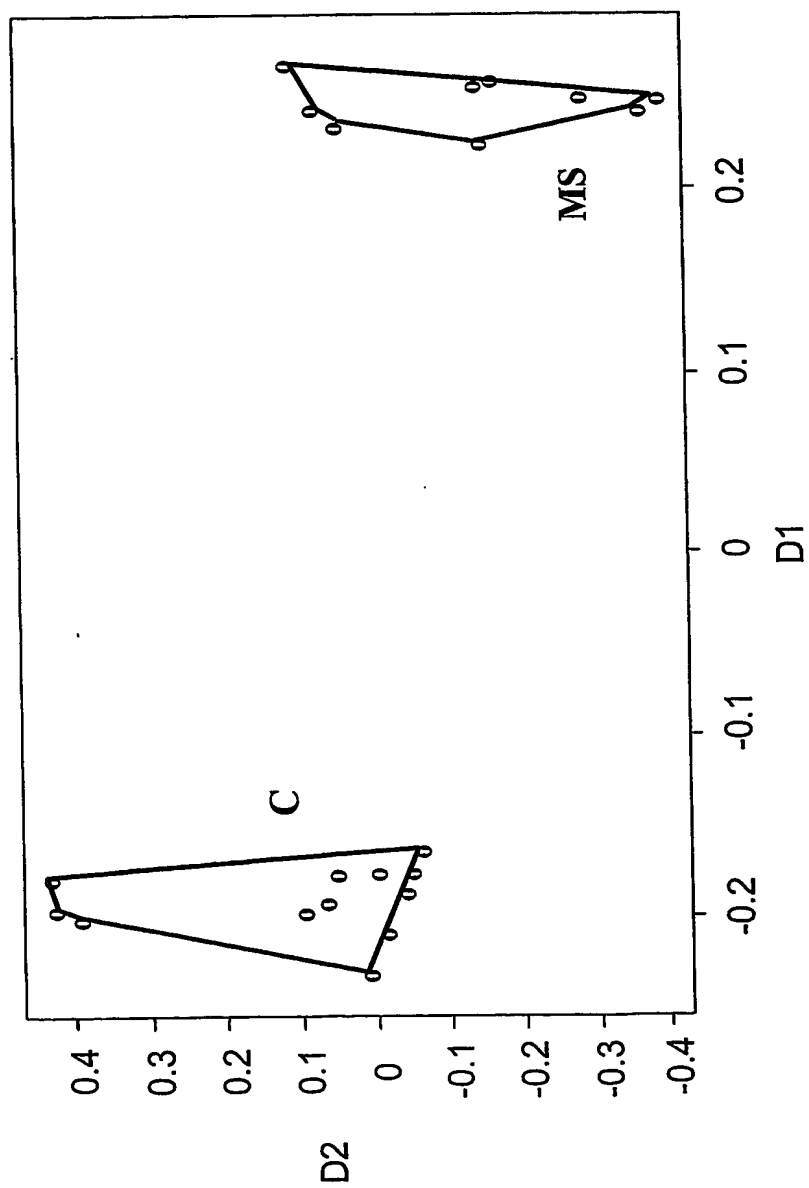


Figure 1

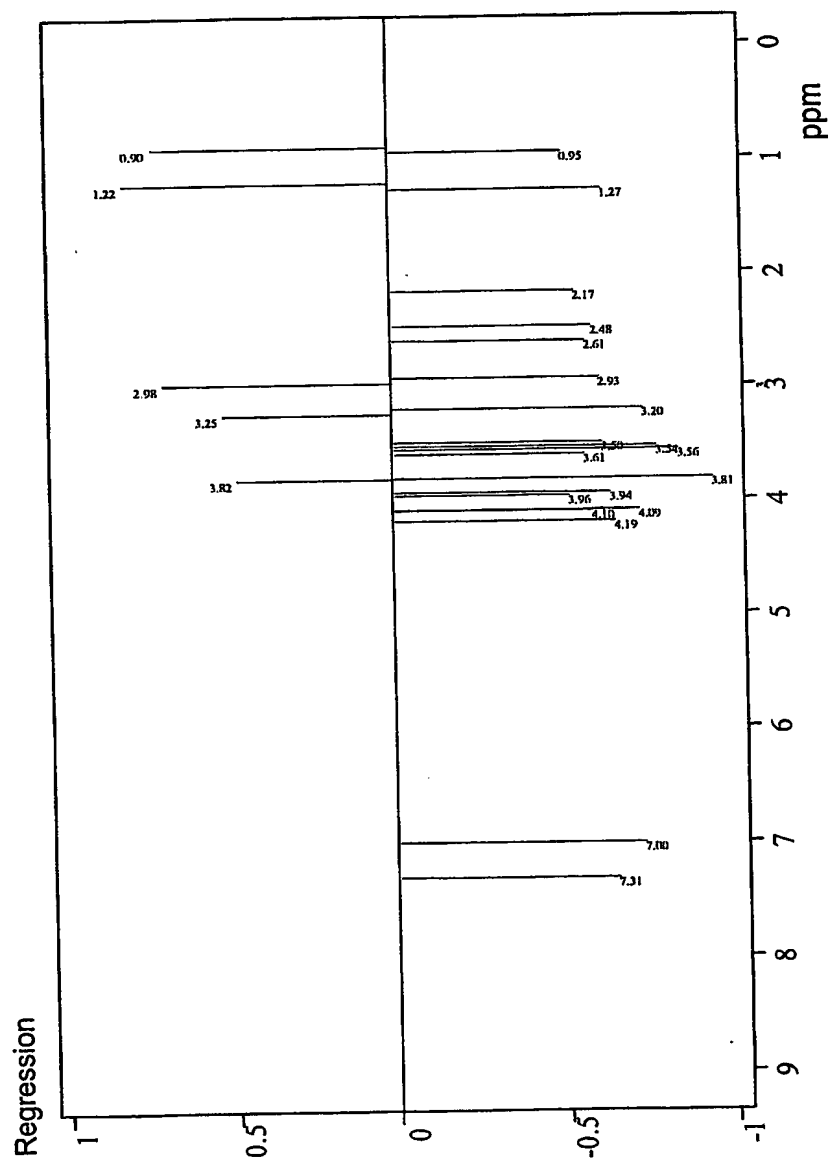


Figure 2